

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類 C12N 15/29, 15/63, 5/10, A01H 1/00, 5/00	A1	(11) 国際公開番号 WO98/40489 (43) 国際公開日 1998年9月17日(17.09.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/00955 (22) 国際出願日 1998年3月10日(10.03.98) (30) 優先権データ 特願平9/55208 1997年3月10日(10.03.97) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日本たばこ産業株式会社(JAPAN TOBACCO INC.)(JP/JP) 〒105-8422 東京都港区虎ノ門2丁目2番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 丸田嘉幸(MARUTA, Yoshiyuki)(JP/JP) 斎藤秀章(SAITO, Hideaki)(JP/JP) 〒438-0802 静岡県磐田郡豊田町東原700番地 日本たばこ産業株式会社 遺伝育種研究所内 Shizuoka, (JP) (74) 代理人 弁理士 社本一夫, 外(SHAMOTO, Ichio et al.) 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 湯浅法律特許事務所 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AU, CA, CN, ID, JP, KR, MX, US, VN, 欧州特 許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: ANTISENSE BASE SEQUENCES (54)発明の名称 アンチセンス塩基配列 (57) Abstract A novel technique for enhancing, in the techniques for inhibiting the synthesis of proteins, the inhibitory effects with the use of antisense base sequences. Specifically, antisense base sequences containing two or more sequences of desired structural genes or parts of the same consecutively linked in the antisense direction; expression vectors having the above antisense base sequences; products of transformation by the above expression vectors; and a method for inhibiting the expression of proteins by using the above antisense base sequences.		

(57) 要約

本発明は、アンチセンス塩基配列を用いてタンパク質合成を抑制する技術において、その抑制能力を高める新規な技術を提供することを目的とする。即ち、本発明は、所望の構造遺伝子もしくはその一部の配列をアンチセンス方向に複数個連続して連結して含むアンチセンス塩基配列、上記アンチセンス塩基配列を有する発現ベクター、上記発現ベクターにより形質転換された形質転換体、および上記アンチセンス塩基配列を使用するタンパク質の発現の抑制方法である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AT	オーストリア	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	TD	チュニジア
AC	アンゴラ	GE	ジョージア	MC	モナコ	TG	トーゴ
AZ	アゼルバイジャン	GH	ガーナ	MD	モルドバ	TJ	タジキスタン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BB	バハマ	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア共和国	TR	トルコ
BE	ベルギー	GU	グアム	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
BG	ブルガリア	DE	ドイツ	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
BJ	ベナン	IL	イスラエル	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
BR	ブラジル	IS	アイスランド	MW	マラウイ	US	米国
BY	ベラルーシ	IT	イタリア	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CC	中央アフリカ共和国	JP	日本	NL	オランダ	VC	ヴァイニョブ
CF	中央アフリカ共和国	KE	ケニア	NO	ノルウェー	YE	イエメン
CG	コンゴ	KR	韓国	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CH	スイス	KG	キルギス	PL	ポーランド		
CI	コートジボワール	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル		
CM	カメルーン	LC	セント・ルシア	PR	プエルトリコ		
CN	中国	LI	リベリア	RO	ルーマニア		
CO	コロンビア	LS	レソト	RS	ロシア		
CZ	チェコ			SE	スウェーデン		
DE	ドイツ			SG	シンガポール		
DK	デンマーク			SI	スロベニア		
EE	エストニア			SK	スロバキア		
ES	スペイン			SL	シエラ・レオネ		

明細書

アンチセンス塩基配列

発明の属する分野

本発明は、アンチセンス塩基配列を用いたタンパク質合成を抑制する技術において、その抑制能力を高める技術に関するものである。

従来の技術

タンパク質の合成の情報となるメッセンジャーRNAのようなある機能を持ったRNAに対して相補的塩基配列を持つRNAがそのRNAの機能を抑制する働きがあることが知られている。これはアンチセンスRNAと総称されるものであり、遺伝子組換え技術によって、アンチセンスRNAを導入した植物を人工的に作り出す研究も進められている。このようなアンチセンスRNAを発現させるための遺伝子としては、プロモーターの下流に目的タンパク質をコードするDNA配列（cDNA、あるいはゲノムDNA）の一部、あるいは完全長の配列をアンチセンスの方向につないだものが用いられている。

このようなアンチセンスを用いた技術としては、以下のものが挙げられる。

（１） 花色色素合成に関与しているチャルコン合成酵素のアンチセンスRNAを産生する組み換えペチュニアを作製し、野生型とは花色の異なるペチュニアが得られている（EP 3 418 85 A）。

（２） トマト果実の軟質化に重要な役割を果たしているポリガラクトツロナーゼ遺伝子が導入されたアンチセンスRNAによって発現が抑制され、野生型よりも保存の効くトマトが作り出されている（EP 8 911 15 A）。

（３） Meltonらは β -グロビンcDNAの完全長の配列をアンチセンス遺伝子として用いている（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:144-148(1985)）。

（４） Stockhausらは光合成の光化学系に関与する10 kDタンパク質cDNAの完全長の配列をアンチセンス遺伝子として用いている（The EMBO Journal 9:3013-3021(1990)）。

(5) Alexander らは花色色素合成に関与しているチャルコン合成酵素 cDNA の完全長の配列をアンチセンス遺伝子として用いている (Nature 333:866-869 (1988))。

(6) Hamillon らはエチレン合成酵素 (ACC-oxidase) cDNA の完全長の配列をアンチセンス遺伝子として用いている (Nature 346:284-287 (1990))。

(7) Smith らはポリガラクトナーゼ cDNA の一部の配列をアンチセンス遺伝子として用いている (Nature 334:724-726 (1988))。

このように、従来はアンチセンス遺伝子として、目的タンパク質をコードしている塩基配列のうち、その一部、あるいは完全長の塩基配列を、単に発現プロモーターの下流に逆向きに挿入することにより作製している。

また、アンチセンス RNA による目的タンパク質の低減化はいくつか報告されているが、植物種子の貯蔵タンパク質などのように生体内に多量に存在しているタンパク質を低減させた報告はない。アンチセンス RNA を用いて生体内に多量に存在しているタンパク質を低減させるには、そのタンパク質の合成される部位に該アンチセンス RNA を多量に作らせる必要がある。その手段の一つとして、アンチセンス遺伝子が多コピーになるように導入させる方法が考えられるが、宿主が植物などのように遺伝的にホモ固定させたい場合、多コピーで導入された遺伝子を自殖によって固定させるのは多大な労力を要する。その他の手段として、アンチセンス遺伝子を発現させるプロモーターの活性を高める方法が考えられるが、容易にはできない。

生体内に多量に存在しているタンパク質を低減させるには、これまで報告されているアンチセンス遺伝子では困難である。

25

発明の概要

アンチセンス遺伝子はその発現量が高くなるほど、タンパク質合成抑制の割合も高くなると考えられている (Melton D.A. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 144-148, Ecker J.R. et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5372-5376)。アンチセンス遺伝子の発現量を高める方法としては、上述したよう

にアンチセンス遺伝子の発現に用いるプロモーターの活性を高める方法、あるいはアンチセンス遺伝子の導入数を高める方法等が考えられるが、上述したような問題点がある。本発明は、生体内におけるタンパク質合成の抑制能力を高めさせ、生体内に多量に存在しているタンパク質をも低減させることができるアンチセンス遺伝子を提供することを目的とするものである。

所望の構造遺伝子の完全長の塩基配列をアンチセンスに導入すると、確かに所望の構造遺伝子による目的タンパク質の合成を制御する効果が、ある程度は高くなる。しかし、この方法は所望の構造遺伝子の完全長の塩基配列をアンチセンス型に導入するので、未知のオープンリーディングフレームが出現し、導入した個体に予期しないタンパク質を発現させる可能性が生じてしまう。特に食用に供される植物の場合、健康への安全性及び味の変化などを検討しなくてはならない。上記のような予期しないタンパク質の発現を抑制させる方法として、構造遺伝子の一部の配列、即ち、オープンリーディングフレームのない部分配列、あるいはオープンリーディングフレームを人為的に欠失させた部分配列を用いることで解決できる。しかし、所望の構造遺伝子の一部を単数個導入するだけでは、所望の構造遺伝子による目的タンパク質の合成を制御する効果が、希望する程度には得られない。そこで、本発明者等は、以上の問題を解決する方法、即ち、未知のタンパク質を発現させることなく、目的タンパク質の合成を制御する効果を高める方法を考えた。その結果、所望の構造遺伝子の一部を複数個連続して連結して含むアンチセンス塩基配列を標的細胞のゲノム遺伝子に導入する方法を見出し、本発明を完成させた。

図面の簡単な説明

- 図 1 は、*in vitro* RNA 合成に用いた遺伝子の構造を示す模式図を示す。
- 図 2 は、小麦胚芽抽出液による翻訳産物の解析のイメージ画像である。
- 図 3 は、グルテリン合成量の変化を示すグラフを示す。
- 図 4 は、形質転換に用いたプラスミドベクターの構造を示す模式図を示す。
- 図 5 は、8 連結グルテリン A アンチセンス遺伝子を導入した形質転換体の PCR 分析を示すイメージ画像である。

図6は、完全長グルテリンAアンチセンス遺伝子を導入した形質転換体のPCR分析を示すイメージ画像である。

図7は、8連結グルテリンAアンチセンス遺伝子を導入した形質転換体のノーザン分析を示すイメージ画像である。

5 図8は、形質転換に用いたプラスミドベクターの構造を示す模式図を示す。

発明の詳細な説明

本発明者は、所望の構造遺伝子もしくはその一部の配列をアンチセンス方向に複数個連続して連結して含むアンチセンス塩基配列を標的細胞のゲノム遺伝子に
10 導入することにより、所望の構造遺伝子がコードするタンパク質の細胞内における発現を効果的に抑制できることを見出し、本発明を完成したものである。

即ち、本発明の一つの側面によれば、所望の構造遺伝子もしくはその一部の配列をアンチセンス方向に複数個連続して連結して含むアンチセンス塩基配列が提供される。本発明のアンチセンス塩基配列から転写されるアンチセンスRNAは
15 、1分子中に目的タンパク質をコードするmRNAの一部分に対して相補的なRNA配列が複数個連続して存在する。したがって、目的タンパク質をコードするmRNAと生体内で対合し、該タンパク質の生体内での発現を抑制する可能性を高くすることができると考えられる。このため、この連続配列を持ったアンチセンスRNAは、連続配列を持たないアンチセンスRNAよりも目的タンパク質の
20 合成を抑制する効果が高いのである。

また本発明の別の側面によれば、本発明のアンチセンス塩基配列を有する発現ベクター、上記発現ベクターにより形質転換された形質転換体、並びに本発明のアンチセンス塩基配列を標的細胞のゲノム遺伝子に導入することを含む、構造遺伝子がコードするタンパク質の細胞内における発現を抑制する方法が提供される。

25

以下、本発明を詳しく説明する。

本発明の第1の側面によれば、所望の構造遺伝子もしくはその一部の配列をアンチセンス方向に複数個連続して連結されたアンチセンス塩基配列が提供される。

本発明でいう「所望の構造遺伝子」とは、発現を低減させたいタンパク質をコ

ードする遺伝子を意味するものである。ここで、発現を低減させたいタンパク質としては、生体内で産生されるタンパク質であれば特に限定されるものではないが、本発明のアンチセンス塩基配列がより有効に働くという観点から、生体内で多量に発現するタンパク質が好ましい。このようなタンパク質の例としては、植物種子の貯蔵タンパク質が挙げられる。より具体的な例としては、例えば、穀類のグルテリン、プロラミン、グロブリン、アルブミン等が挙げられ、特にイネのグルテリン、コムギのグルテニン、トウモロコシのゼイン、オオムギのホールデインは種子中に多量に存在している。その他の例としては、ダイズのコングリシニン、インゲンマメのファゼオリン、イモ類の主要タンパク質であるジャガイモのバタチン、サツマイモのスポラミン等が挙げられる。

後述する実施例においては、コメの貯蔵タンパク質グルテリンAおよびBを用いているが、これは本発明の実施態様の一例を示すものに過ぎない。

本発明においては、この構造遺伝子の全配列を用いてもよく、またその一部の配列を用いてもよい。一部の配列を用いる場合は、構造遺伝子の5'側の配列を用いることが好ましいが、これは、構造遺伝子の翻訳開始部位に対応する相補配列を使用する方が、より効果的に目的タンパク質の発現を低下させることができると考えられるためである。

また、一部の配列を使用する場合、配列の長さは特に限定されるものではないが、一般的には少なくとも45塩基以上であることが好ましく、特に好ましくは少なくとも300塩基以上である（多田ら（1996）育種学雑誌 46, 403-407）。

本発明のアンチセンス塩基配列は、上記の配列をアンチセンス方向に複数個連続して連結して含むものである。

本明細書中において、「アンチセンス方向」とは、宿主細胞に内在するDNA配列に、少なくとも一部相補的となる遺伝子を含むDNA配列がもたらされる方向のことである。この相補的遺伝子からの転写物は、宿主に内在性のRNA、特にmRNA上に存在する配列に相補的である配列を有している。

また本明細書中において、「複数個」とは、少なくとも2個以上の意味であるが、好ましくは4個以上、特に好ましくは8個以上を意味する。

さらに、本明細書中において、「連続して」とは、これらの配列の間に他の塩

基が存在しないか、存在したとしても少なくともプロモーター配列等の構造遺伝子の発現に大きな影響を及ぼす配列は連結されていないことを意味するものである。

5 本発明においては、アンチセンス塩基配列を複数個連結する方法は、遺伝子工学技術において通常用いられるものを適宜用いることができ、特に限定されるものではない。

例えば、クローニングされた所望の構造遺伝子を含むプラスミドから、構造遺伝子の全長を含むインサート配列または構造遺伝子の一部を含むインサート配列を切り出し、このインサート配列の両末端に異なる制限部位をリンカーの付加などにより導入しておく。この場合、続くクローニングに使用するベクター（例えば、プラスミドベクター）のクローニング部位の制限配列を考慮に入れて、得られるプラスミドが当該構造遺伝子をアンチセンス方向に含むように、インサート配列の両末端の制限部位を設計することが重要である。次いで、両末端に異なる制限部位を有するベクターと、この制限部位に対応する制限部位を両末端に有する上記インサート配列をライゲーションさせることにより、アンチセンス塩基配列を1つ含む遺伝子構築物が得られる。

20 次いで、この構築物をさらに制限酵素で処理して直線状にし、その両方の末端に異なる制限部位を導入しておく。そして上記と同様に、構造遺伝子の全長または一部を含むインサート配列の両方の末端に対応する制限部位を導入した配列を作製する。次いで、これらをライゲーションすることにより、アンチセンス塩基配列を2つ含む遺伝子構築物が得られる。

25 以下、これと同様の操作を反復することにより、任意の数のアンチセンス塩基配列を含む遺伝子構築物を得ることができる。なお、アンチセンス塩基配列を2つ含む遺伝子構築物と、そのインサート配列とを使用することにより、アンチセンス塩基配列を4つ含む遺伝子構築物を1回のライゲーションにより作成することができる。同様に、アンチセンス塩基配列を4つ含む遺伝子構築物と、そのインサート配列とを使用することにより、アンチセンス塩基配列を8つ含む遺伝子構築物を1回のライゲーションにより作成することができる。

なお、本発明のアンチセンス塩基配列の実施態様の一つとしては、所望の構造

遺伝子もしくはその一部の配列が、異なる種類の複数の構造遺伝子もしくはその一部の配列から構成されている、アンチセンス塩基配列が含まれる。即ち、異なる種類の複数の構造遺伝子の発現を同時に抑制したい場合は、プロモーターの下流に本発明のアンチセンス塩基配列を連結し、これにターミネーターを連結させた形質転換用構築遺伝子を複数個連結した形質転換用構築遺伝子を用いることができる。それぞれの構築遺伝子に、それぞれ異なる種類の構造遺伝子もしくはその一部をアンチセンス方向に連続して連結したアンチセンス配列を用いることにより、単一の形質転換用構築遺伝子を導入することにより複数の構造遺伝子の発現を抑制することを可能とするものである。

10 本発明の第2の側面によれば、本発明のアンチセンス塩基配列を有する発現ベクターが提供される。

発現ベクターを構築する際に使用する、プロモーター、ターミネーター等の調節配列、形質転換に用いるベクターなどは、遺伝子工学技術において通常用いられるものを適宜用いることができ、特に限定されるものではない。

15 プロモーターの例としては、例えばグルテリンプロモーター、コングリシニンプロモーター、ファゼオリンプロモーター、ADHプロモーター、熱ショックプロモーター、組織特異性プロモーター、果実の成熟に関連するプロモーター、プロラミンプロモーター、RUBPカルボキシラーゼ小サブユニットのプロモーター、カリフラワーモザイクウィルスのプロモーターなどが挙げられる。

20 ターミネーターの例としては、例えば、ノバリン合成酵素のターミネーター、カリフラワーモザイクウィルスのターミネーターなどが挙げられる。

ベクターの例としては、例えば、pUCプラスミドベクター、pBRプラスミドベクター、Tiプラスミドベクター、Riプラスミドベクターなどが挙げられる。

25 本発明の第3の側面によれば、本発明の発現ベクターにより形質転換された形質転換体が提供される。

形質転換される生物体の種類は特に限定されず、植物、動物、微生物等から目的に応じ任意に選択することができる。本発明においては、形質転換体は、好ましくは植物、特に単子葉植物および双子葉植物等の高等植物であり、特に好ま

しくは、例えば穀類（イネ、コムギ、トウモロコシ、オオムギなど）、ダイズ、インゲンマメ、またはイモ類（ジャガイモ、サツマイモなど）である。

本発明の第４の側面によれば、本発明のアンチセンス塩基配列を標的細胞のゲノム遺伝子に導入することにより、構造遺伝子がコードするタンパク質の細胞内
5 における発現を抑制する方法が提供される。

本発明のアンチセンス塩基配列を標的細胞のゲノム遺伝子に導入する方法は、特に限定されず目的に応じて適宜好適な形質転換技術を使用することができる。

例えば、植物の細胞のゲノム遺伝子にアンチセンス塩基配列を導入するためには、アグロバクテリウム ツメファシエンズを用いる方法、プロトプラストによる
10 エレクトロポレーション、リボゾーム融合、マイクロインジェクション等の方法が挙げられる。

アンチセンス塩基配列導入に成功した植物細胞は、抗生物質耐性細胞の選抜などの方法によりスクリーニングすることができる。このようにして形質転換された植物細胞をカルス培養して完全植物体に再生することができる。再生した植物
15 は、通常の交配法で安定した品種へ固定することができる。

動物の細胞のゲノム遺伝子にアンチセンス塩基配列を導入するためには、エレクトロポレーション、リボゾーム融合、マイクロインジェクション等の方法が挙げられる。

微生物の細胞のゲノム遺伝子にアンチセンス塩基配列を導入するためには、カルシウム法、エレクトロポレーション等の方法が挙げられる。
20

以下の実施例により本発明をより具体的に例示するが、本発明は実施例により限定されるものではない。

実施例

25 本実施例においては、アンチセンスRNAを用いて、コメの貯蔵タンパク質グルテリンの発現を抑制し、コメ胚乳中のグルテリン含量を低減させることを目的とした。コメのグルテリンは、イネゲノム当たり１０個以上の遺伝子があり、それらは塩基配列の相同性が６５％を示すグルテリンAとグルテリンBに分けられる。コメのグルテリン含量を低減させることは、醸造用の酒米としての利用に適

している。

以下に実施例のステップを簡単にまとめる。なお、以下の実施例において特に断りがない限り Maniatis T. et al. (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor (1982)) 記載の方法に従った。

- 5 (a) コメの貯蔵タンパク質グルテリンAとグルテリンBの完全長cDNAを単離した(Okitaら (1989) Journal Biochemical Chemistry 264: 12573-12581)。なお、グルテリンA完全長cDNA配列を配列表の配列番号1に、グルテリンB完全長cDNA配列を配列表の配列番号2に示す。

- 10 (b) グルテリンA完全長cDNAの5' 上流312bpsの配列を、複数個直列に、アンチセンスの方向に連結させた。

(c) 上記連結アンチセンス遺伝子を鋳型にin vitroで転写反応を行い、連結アンチセンスRNAを作製した。

(d) 上記連結アンチセンスRNAとグルテリンAのセンスRNAとの混合液を用いてin vitroで翻訳反応を行い、グルテリン合成量を調査した。

- 15 (e) グルテリンプロモーターの下流にヒマカタラーゼ遺伝子の第1イントロン(Ohta S. et al. (1990) Plant Cell Physiol. 31, 805-813)を挿入し、さらにその下流に完全長グルテリンAのcDNAの5' 上流312bpsの配列をアンチセンスの方向に8個連結させた。ノバリン合成酵素のターミネーターを付加して発現プラスミドベクターを作製した。同様にして、完全長グルテリンBのcDNAの5' 上流287bpsの配列をアンチセンスの方向に8個連結させたアンチセンス遺伝子を作製し、上記発現プラスミドベクターに挿入した。

20 (f) 上記プラスミドベクターをイネに形質転換し、得られたコメのグルテリン含量を調査した。

25 実施例1: in vitroでの連結アンチセンスRNAの効果

(1) in vitroによるRNA合成

(1-1) グルテリンAセンスmRNAの合成

ブルースクリプト (TOYOBO社製) のT7プロモーターの下流のマルチクローニングサイトEcoRI/BamHI部位に完全長のグルテリンAのcDNAをセ

ンス方向に挿入した（図1：Glu sense RNA）。転写反応は、上記のDNA溶液（50 μ l、DNA 5 μ gを含む）に、20mMのATP/CTP/GTP混合液（4 μ l）、2.5mMのGTP（1 μ l）、5mMのCap analog（5 μ l）、0.5MのDTT（1 μ l）、RNaseインヒビター（50ユニット）、T7RNAポリメラーゼ（10ユニット）を加え、反応混合液を37℃で30分インキュベーションした後、20mMのGTP（1 μ l）を加え、さらに37℃で4.5時間インキュベートして行った。

（1-2）グルテリンAアンチセンスRNAの合成

ブルースクリプト（TOYOBO社製）のT7プロモーターの下流のマルチクローニングサイトBamHI/EcoRI部位に完全長のグルテリンAのcDNAをアンチセンスの方向に挿入した（anti-full RNA）。また、グルテリンAのcDNAの5'端より312bpsの配列をアンチセンスの方向に1個（antix1 RNA）、4個（antix4 RNA）、8個（antix8 RNA）をそれぞれ直列に連結させた（図1）。まず、グルテリンAのcDNAの5'末端より312bpsの位置にあるStuI部位にXbaIリンカー（CTCTAGAG）を付加し、そのBamHI/XbaI断片をブルースクリプト（TOYOBO社製）のT7プロモーターの下流のマルチクローニングサイトXbaI/BamHIに挿入して antix1 RNA プラスミドを作製した。さらに、グルテリンAのcDNAの5'末端より312bpsの位置にあるStuI部位にBamHIリンカー（CGGATCCG）を付加し、そのBamHI/ScaI断片を、上記 antix1 RNA プラスミドのBamHI/SmaI部位に挿入し、antix2 RNAプラスミドを作製した。このXbaI部位をDNAポリメラーゼで平滑化した後、EcoRIで処理した断片を antix2 RNA プラスミドのPstI部位をDNAポリメラーゼで平滑化した後、EcoRIで処理した部位に挿入し、antix4 RNA プラスミドを作製した。このXbaI部位をDNAポリメラーゼで平滑化した後、XhoIで処理した断片を antix4 RNA プラスミドのHincII/XhoI部位に挿入し、antix8 RNAプラスミドを作製した。

転写反応は、それぞれのプラスミド（DNA 5 μ g）に20mMのATP/CTP/UTP/GTP混合液（5 μ l）、0.5MのDTT（1 μ l）、RN

aseインヒビター（50ユニット）、T7 RNAポリメラーゼ（10ユニット）を加え、37℃で5時間インキュベートして行った。

（2）小麦胚芽抽出液によるin vitro翻訳反応

グルテリンへの翻訳活性を有する Glu sense RNA（2ピコモル）に対して、グル
5 ルテリンのアンチセンスRNAであるanti-full RNA、antix1 RNA、antix4 RNA
および antix8 RNA をそれぞれ0.2ピコモル、0.5ピコモル、1ピコモルお
よび2ピコモルになるように混合した後、小麦胚芽抽出液（アマシャム社）によ
る翻訳反応を行った。翻訳反応は1mMのアミノ酸混合液（メチオニンを除いた
19種類）2μl、35S-メチオニン（1000ci/mmol）0.5μl
10 に小麦胚芽抽出液15μlを加え30℃で1時間インキュベートして行った。反
応液に20%のSDS（2.5μl）を加え、95℃で5分間処理した後、翻訳
産物を13%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した。イメージアナライザ
ー（富士写真フイルム）により、放射能の検出、測定を行った。

（3）in vitroでのアンチセンスRNA効果の解析

15 上記RNAを用いて行った小麦胚芽抽出液による翻訳産物の合成量をイメージ
アナライザーによって解析した（図2）。RNAを添加していないレーンにはバ
ンドは出現しなかったが（レーン1）、グルテリンの sense RNAのみを加えると
グルテリンのバンドが出現した（レーン2）。さらに、添加したアンチセンスR
NAのモル数の上昇にともなってグルテリンのバンドも薄くなることが示された
20 （レーン3～6）。

グルテリンバンドの放射線量を測定し、各条件でのグルテリン合成量を調査し
た。結果はアンチセンスRNAを加えていない時のグルテリンの合成量を100
としたときの、各条件におけるグルテリン合成量をグラフで示した（図3）。グ
ルテリンAのcDNAの5'上流312bpsの配列の連結数を多くするほど、
25 グルテリン合成量は低下した。また、グルテリン完全長のアンチセンスRNAよ
りも、5'上流の312bpsの配列を4個、あるいは8個連結させたアンチセ
ンスRNAの方が低減効果が高かった。

実施例2：グルテリンAアンチセンス遺伝子を導入した形質転換体の作出と解析

(1) 形質転換用8連結グルテリンAアンチセンス遺伝子の構築

グルテリンプロモーター(高岩ら(1987) FEBS Lett. 221: 43-47)の下流の S c a I / X b a I 部位にヒマカタラーゼ遺伝子の第1イントロン (Ohia S. et al. (1990) Plant Cell Physiol. 31, 805-813) を含む S m a I / X b a I 断片を
5 挿入し、さらにその下流に完全長グルテリンAのcDNAの5' 上流312bp
sの配列をアンチセンスの方向に8個連結させたX b a I / S a c I 断片を挿入
した。ノバリン合成酵素のターミネーター(Depikerら(1982) J. Mol. Appl. Ge
net. 561-573) を含む S a c I / E c o R I 断片を付加した後、ハイグロマイシ
ン抵抗性遺伝子との同時形質転換用プラスミドベクターへ組み込み、pSBHC
10 I x 8 A を作製した(図4)。このプラスミド中に挿入した上記イントロンは、
グルテリンAアンチセンス遺伝子の発現活性を増大させる役割を果たす。

(2) 形質転換用完全長グルテリンAアンチセンス遺伝子の構築

グルテリンプロモーターの下流の S c a I / X b a I 部位にヒマカタラーゼ遺
伝子の第1イントロン (Ohia S. et al. (1990) Plant Cell Physiol. 31, 805-8
15 13) を含む S m a I / X b a I 断片を挿入し、さらにその下流に完全長グルテリ
ンAのcDNAの S a c I / X b a I 断片をアンチセンスの方向に結合させた。
ノバリン合成酵素のターミネーターを含む S a c I / E c o R I 断片を付加した
後、ハイグロマイシン抵抗性遺伝子との同時形質転換用プラスミドベクターへ組
み込み、pSBHC I - F A を作製した(図4)。

20 (3) イネへの形質転換

上記プラスミドベクターpSBHC I x 8 AおよびpSBHC I - F A を保持
したアグロバクテリウムLBA4404を用いて、水稻品種「月の光」へ Hiei
et al. (Plant J. 6, 271-282(1994))の方法により形質転換を行った。形質転換
カルスの選抜はハイグロマイシンを用いて Hiei et al. (同上)の方法に従い行
25 った。

(4) DNAおよびRNAの調製

形質転換体からのDNAの調製は閉鎖系温室でのポット栽培に移る前の再分化
幼植物体を用いて行った。

RNAの調製はSDS-フェノール法(植物遺伝子工学マニュアル、講談社、

内宮ら)により行った。

(5) 形質転換体のPCR分析、およびノーザン分析

PCR反応によりグルテリンアンチセンス遺伝子の配列を増幅させることにより形質転換の確認を行った。ゲノムDNA (120 ng)、4種dNTPs (200 μM)、プライマー (10 pmol/反応)、Taq DNAポリメラーゼ (宝酒造) (1 unit) を加え、94℃、50℃、72℃各2分の反応を1サイクル行った後、各1分の反応を34サイクル行った。8連結グルテリンAアンチセンス遺伝子の増幅には、

5'-AGTGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTT-3' (SEQ ID NO:3)

10 5'-AGTACATAGCAGCAAAACAT-3' (SEQ ID NO:4)

のプライマーを、完全長グルテリンAアンチセンス遺伝子の増幅には、

5'-TACATAGCTTTAACTGATAATCTGA-3' (SEQ ID NO:5)

5'-AGTACATAGCAGCAAAACAT-3' (SEQ ID NO:6)

のプライマーを用いて行った。

15 ノーザン分析は全RNA (20 μg) を1%アガロースゲルで電気泳動した後、定法に従い行った。8連結グルテリンAアンチセンス遺伝子の導入が確認された形質転換体、および対照としてハイグロマイシン抵抗性遺伝子のみが導入された形質転換体の開花8日目の未熟種子より、それぞれ調製した全RNAを用いて行った。プローブはグルテリンAのcDNAの5'上流の312 bpsの配列を用いて行った。

20 ノーザン分析に用いたプローブはDNA断片25 ngをレディプライムDNAラベリングシステム (アマシャム) により³²Pラベルした。

(6) 8連結グルテリンAアンチセンス遺伝子を導入した形質転換体の作出

25 ハイグロマイシンに耐性を示したカルスより再分化させたところ、8連結グルテリンAアンチセンス遺伝子を形質転換したカルスより、独立な再分化固体が20系統得られた。アンチセンス遺伝子導入の確認のために、PCR反応を行った後、アガロース電気泳動により分離した結果を図5に示した。導入に用いたアンチセンス遺伝子を保持したプラスミドを鋳型にPCR反応を行ったレーンでは、期待される約1.2 kbpsの位置にバンドが現れた (図5:レーン2)。形質

転換体 20 系統も同じ 1. 2 k b p s の位置にバンドが現れた (図 5 : レーン 3 ~ 2 2) 。また、非形質転換体より調製した DNA を鋳型にして行った P C R 反応のレーンではバンドは現れなかった (図 5 : レーン 2 3) 。

したがって、形質転換体 20 系統は 8 連結グルテリン A アンチセンス遺伝子を保持していると結論された。

(7) 完全長グルテリン A アンチセンス遺伝子を導入した形質転換体の作出

ハイグロマイシンに耐性を示したカルスより再分化させたところ、完全長グルテリン A アンチセンス遺伝子を形質転換したカルスより、独立な再分化個体が 18 系統得られた。アンチセンス遺伝子導入の確認のために、P C R 反応を行った後、アガロース電気泳動により分離した結果を図 6 に示した。導入に用いたアンチセンス遺伝子を保持したプラスミドを鋳型に P C R 反応を行ったレーンでは、期待される約 1. 7 k b p s の位置にバンドが現れた (図 6 : レーン 2) 。形質転換体 18 系統も同じ 1. 7 k b p s の位置にバンドが現れた (図 6 : レーン 3 ~ 2 0) 。また、非形質転換体より調製した DNA を鋳型にして行った P C R 反応のレーンではバンドは現れなかった (図 6 : レーン 2 1) 。

したがって、形質転換体 18 系統は完全長グルテリン A アンチセンス遺伝子を保持していると結論された。

(8) 形質転換体未熟種子中の転写物量の解析

対照 5 系統、および形質転換体 10 系統を供試したノーザン分析の結果を図 7 に示した。8 連結グルテリン A アンチセンス遺伝子を導入した形質転換体ではグルテリン A の m R N A 量が対照 5 系統 (図 7 : レーン 1 ~ 5) に比べて明らかに低減していた (図 7 : レーン 6 ~ 1 5) 。シグナルの強度をバイオイメージングアナライザー B A S 1 0 0 0 (富士写真フィルム社製) によって測定した結果を表 1 に示した。結果は対照 5 系統の平均値を 1 0 0 としたときの値で示した。導入した 8 連結グルテリン A アンチセンス遺伝子の作用により、形質転換体では未熟種子中のグルテリン A の m R N A 量が特異的に低減していることが確認された。

表 1 : 未熟種子中の転写物量

レーン番号										
対照	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
100	31.1	11.9	13.1	11.7	10.0	7.7	8.2	3.8	3.0	1.2

(9) 種子タンパク質含量の測定

自殖種子の玄米を粉砕し、その50mgより抽出したタンパク質を14%ポリ
 アクリルアミド電気泳動で分離した後、ゲルをクマシーブルーで染色した。ゲル
 上のグルテリンの相対タンパク質含量はデンストメーター Model GS-670 (

5 BIO-RAD社)を用いて測定した。

結果は非形質転換体の自殖種子のグルテリン含有量を100としたときの百分
 率によって示した(表2および3)。

グルテリン含有量は8連結グルテリンAアンチセンス遺伝子の場合、平均63
 . 2%に、完全長グルテリンAアンチセンス遺伝子の場合、平均75. 4%に低

10 減していた。

また、8連結グルテリンAアンチセンス遺伝子、および完全長グルテリンAア
 ンチセンス遺伝子を導入した形質転換体のグルテリン含有量について、統計処理
 を行ったところ、8連結グルテリンAアンチセンス遺伝子導入形質転換体のグル
 テリン含有量の方が10%水準で有意に低いことが確認された。

表 2 : 形質転換体のグルテリン含有量 (対照を100とする)

8 連結グルテリンAアンチセンス遺伝子導入形質転換体

系統番号	グルテリン含有量	系統番号	グルテリン含有量
1	59. 9	11	66. 0
2	66. 9	12	76. 2
3	42. 3	13	48. 1
4	42. 6	14	83. 4
5	66. 6	15	71. 7

6	77.0	16	98.2
7	39.7	17	67.8
8	40.1	18	61.0
9	55.5	19	93.2
10	46.1	20	61.2

表3：形質転換体のグルテリン含有量（対照を100とする）

完全長グルテリンAアンチセンス遺伝子導入形質転換体

系統番号	グルテリン含有量	系統番号	グルテリン含有量
1	95.2	10	77.9
2	38.9	11	59.3
3	107.2	12	60.3
4	56.3	13	41.2
5	96.2	14	96.2
6	110.6	15	60.5
7	73.6	16	114.3
8	72.1	17	47.4
9	66.6	18	83.0

実施例3：グルテリンAおよびBアンチセンス遺伝子を導入した形質転換体の作
出と解析

(1) 形質転換用8連結グルテリンA・Bアンチセンス遺伝子の構築

- 5 グルテリンプロモーターの下流のScaI/XbaI部位にヒマカタラーゼ遺
伝子の第1イントロン (Ohita S. et al. (1990) Plant Cell Physiol. 31, 805-8
13) を含むSmaI/XbaI断片を挿入し、さらにその下流に完全長グルテリ
ンBのcDNAの5' 上流287bpsの配列をアンチセンスの方向に8個連結
させたXbaI/SphI断片を挿入した。ノバリン合成酵素のターミネーター
を含むSphI/HindIII断片を付加した後、実施例2で作製したプラス

ミドベクターpSBHC I x 8 AのHind I I I部位に挿入し、pSBHC I x 8 A Bを作製した(図8)。

(2) 形質転換用完全長グルテリンA・Bアンチセンス遺伝子の構築

グルテリンプロモーターの下流のSca I/Xba I部位にヒマカタラーゼ遺伝子の第1イントロン(Ohta S. et al. (1990) Plant Cell Physiol. 31, 805-813)を含むSma I/Xba I断片を挿入し、さらにその下流に完全長グルテリンBのcDNAのSph I/Xba I断片をアンチセンスの方向に結合させた。ノバリン合成酵素のターミネーターを含むSph I/Hind I I I断片を付加した後、実施例2で作製したプラスミドベクターpSBHC I -FAのHind I I I部位に挿入し、pSBHC I -FABを作製した(図8)。

(3) イネへの形質転換

上記プラスミドベクターpSBHC I x 8 A BおよびpSBHC I -FABを保持したアグロバクテリウムLBA4404を用いて、水稻品種「月の光」へHiei et al. (Plant J. 6:271-282(1994))の方法により形質転換を行った。形質転換カルの選抜はハイグロマイシンを用いてHiei et al.の方法に従い行った。

(4) 種子タンパク質含量の測定

得られた形質転換体より自殖種子の玄米を粉碎し、その50mgより抽出したタンパク質を14%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した後、ゲルをクマシーブルーで染色した。ゲル上のグルテリンの相対タンパク質含量はデンストメーター Model GS-670 (BIO-RAD 社製)を用いて測定した。

結果は非形質転換体の自殖種子のグルテリン含有量を100としたときの百分率によって示した(表4)。

グルテリン含有量は8連結グルテリンA・Bアンチセンス遺伝子の場合、平均57.1%に、完全長グルテリンA・Bアンチセンス遺伝子の場合、平均69.3%に低減していた。

また、8連結グルテリンA・Bアンチセンス遺伝子、および完全長グルテリンA・Bアンチセンス遺伝子を導入した形質転換体のグルテリン含有量について、統計処理を行ったところ、8連結グルテリンA・Bアンチセンス遺伝子導入形質転換体のグルテリン含有量の方が10%水準で有意に低いことが確認された。

表4：グルテリン含有量

	平均値
非形質転換体	100
8連結グルテリンA・Bアンチセンス 遺伝子導入形質転換体	57.1
完全長グルテリンA・Bアンチセンス 遺伝子導入形質転換体	69.3

実施例4：グルテリンAアンチセンス遺伝子を導入した形質転換体の作出と解析

(1) 形質転換用2連結グルテリンA、および4連結グルテリンAアンチセンス遺伝子の構築

グルテリンプロモーターの下流の Sca I, Xba I 部位にヒマカタラーゼ遺伝子の第1イントロン (Ohta S. et al. (1990) Plant Cell Physiol. 31, 805-813) を含む Sma I, Xba I 断片を挿入し、さらにその下流に完全長グルテリンA cDNA の5' 上流 312bps の配列をアンチセンスの方向に2個、あるいは4個連結させた Xba I, Sac I 断片を挿入した。ノバリン合成酵素のターミネーターを含む Sac I, EcoR I 断片を付加した後、ハイグロマイシン抵抗性遺伝子との同時形質転換用プラスミドベクターへ組み込み、pSBHC1x2A および pSBHC1x4Aを作製した。

(2) イネへの形質転換

上記プラスミドベクター pSBHC1x2A, および pSBHC1x4A を保持したアグロバクテリウム LBA4404を用いて、水稻品種「月の光」へ Hiei et al. (Plant J. 6, 271-282 (1994)) の方法により形質転換を行った。形質転換カルスの選抜はハイグロマイシンを用いて Hiei et al. (同上) の方法に従い行った。

(3) 種子タンパク質含量の測定

得られた形質転換体より自殖種子の玄米を粉碎し、その 50mg より抽出したタンパク質を 14 %ポリアクリルアミド電気泳動で分離した後、ゲルをクマシーブルーで染色した。ゲル上のグルテリンの相対タンパク質含量はデンストメーター

Model GS-670 (BIO- RAD) を用いて測定した。

結果は非形質転換体の自殖種子のグルテリン含有量を 100 としたときの百分率によって示した(表5、6)。

- グルテリン含有量は2連結グルテリンAアンチセンス遺伝子の場合、平均 71.7 %に、4連結グルテリンAアンチセンス遺伝子の場合、平均 71.5 %に低減していた。

表5. 形質転換体のグルテリン含有量(対照を 100 とする)
2連結グルテリンAアンチセンス遺伝子導入形質転換体

系統番号	グルテリン含有量
1	66.5
2	66.2
3	67.5
4	93.8
5	64.2
6	60.6
7	75.0
8	79.5
平均	71.7

表6. 形質転換体のグルテリン含有量 (対照を 100 とする)
4 連結グルテリンAアンチセンス遺伝子導入形質転換体

系統番号	グルテリン含有量
1	54.7
2	89.0
3	93.9
4	64.1
5	68.0
6	66.7
7	67.0
8	73.1
9	67.0
平均	71.5

発明の効果

- 本発明のアンチセンス塩基配列は、所望の構造遺伝子もしくはその一部の配列をアンチセンス方向に複数個連続して連結されたアンチセンス塩基配列であるので、本発明のアンチセンス塩基配列より転写されるアンチセンスRNAは、1分子中に目的タンパク質をコードするmRNAの一部分に対して相補的なRNA配列が複数個連続して存在する。したがって、目的タンパク質をコードするmRNAと生体内で対合し、該タンパク質の生体内での発現を抑制する可能性を高くすることができると考えられる。このため、この連続配列を持ったアンチセンスRNAは連続配列を持たないアンチセンスRNAよりも目的タンパク質の合成を抑制する効果を上げることができる。

本明細書中では主として植物タンパク質の合成抑制を例として説明されている

が、本発明のアンチセンス塩基配列は動物のタンパク質合成の抑制にも使用できる。例えば、ミルク中の特定のタンパク質の合成を抑制したり、免疫疾患、病原因子による疾患等における治療を目的として特定のタンパク質の発現を抑制するために、本発明のアンチセンス塩基発現を使用できることは言うまでもない。

配列表

配列番号 1

配列の長さ: 1 6 4 4

配列の型: 核酸

鎖の数: 2 本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

起源

生物名:

性質: グルテリンAのcDNA

配列の特徴

配列

```

AAGTACGACG AAAATTCATT AGTACTACAA CAAC ATG GCA TCC ATA AAT CGC CCC   55
                                     Met Ala Ser Ile Asn Arg Pro
                                     1           5

ATA GTT TTC TTC ACA GTT TGC TTG TTC CTC TTG TGC AAT GGC TCT CTA   103
Ile Val Phe Phe Thr Val Cys Leu Phe Leu Leu Cys Asn Gly Ser Leu
      10           15           20

GCC CAG CAG CTA TTA GGC CAG AGC ACT AGT CAA TGG CAG AGT TCT CGT   151
Ala Gln Gln Leu Leu Gly Gln Ser Thr Ser Gln Trp Gln Ser Ser Arg
      25           30           35

CGT GGA AGT CCA AGA GAA TGC AGG TTC GAT AGG TTG CAA GCA TTT GAG   199
Arg Gly Ser Pro Arg Glu Cys Arg Phe Asp Arg Leu Gln Ala Phe Glu
      40           45           50           55

CCA ATT CGG AGT GTG AGG TCT CAA GCT GGC ACA ACT GAG TTC TTC GAT   247
Pro Ile Arg Ser Val Arg Ser Gln Ala Gly Thr Thr Glu Phe Phe Asp
      60           65           70

GTC TCT AAT GAG CAA TTT CAA TGT ACC GGA GTA TCT GTT GTC CGT CGA   295
Val Ser Asn Glu Gln Phe Gln Cys Thr Gly Val Ser Val Val Arg Arg
      75           80           85

```


GTT ATT GAA CCT AGA GGC CTT CTA CTA CCC CAT TAC ACT AAT GGT GCA	343
Val Ile Glu Pro Arg Gly Leu Leu Leu Pro His Tyr Thr Asn Gly Ala	
90 95 100	
TCT CTA GTA TAT ATC ATC CAA GGG AGA GGT ATA ACA GGG CCA ACT TTC	391
Ser Leu Val Tyr Ile Ile Gln Gly Arg Gly Ile Thr Gly Pro Thr Phe	
105 110 115	
CCA GGC TGT CCT GAG TCC TAC CAA CAA CAG TTC CAA CAA TCA GGC CAA	439
Pro Gly Cys Pro Glu Ser Tyr Gln Gln Gln Phe Gln Gln Ser Gly Gln	
120 125 130 135	
GCC CAA TTG ACC GAA AGT CAA AGC CAA AGT CAA AAG TTC AAG GAT GAA	487
Ala Gln Leu Thr Glu Ser Gln Ser Gln Ser Gln Lys Phe Lys Asp Glu	
140 145 150	
CAT CAA AAG ATC CAC CGT TTC AGA CAA GGA GAT GTA ATT GCA TTG CCT	535
His Gln Lys Ile His Arg Phe Arg Gln Gly Asp Val Ile Ala Leu Pro	
155 160 165	
GCT GGT GTA GCT CAT TGG TGC TAC AAT GAT GGT GAA GTG CCA GTT GTT	583
Ala Gly Val Ala His Trp Cys Tyr Asn Asp Gly Glu Val Pro Val Val	
170 175 180	
GCC ATA TAT GTC ACT GAT CTC AAC AAC GGT GCT AAT CAA CTT GAC CCT	631
Ala Ile Tyr Val Thr Asp Leu Asn Asn Gly Ala Asn Gln Leu Asp Pro	
185 190 195	
AGG CAA AGG GAT TTC TTG TTA GCT GGA AAT AAG AGA AAC CCT CAA GCA	679
Arg Gln Arg Asp Phe Leu Leu Ala Gly Asn Lys Arg Asn Pro Gln Ala	
200 205 210 215	
TAC AGG CGT GAG GTT GAG GAG CGG TCA CAG AAC ATA TTT AGT GGC TTT	727
Tyr Arg Arg Glu Val Glu Glu Arg Ser Gln Asn Ile Phe Ser Gly Phe	
220 225 230	
AGC ACT GAA CTA CTT AGC GAG GCT CTT GGC GTA AGC GGC CAA GTG GCA	775
Ser Thr Glu Leu Leu Ser Glu Ala Leu Gly Val Ser Gly Gln Val Ala	
235 240 245	
AGG CAG CTC CAA TGT CAA AAT GAC CAA AGA GGA GAA ATT GTC CGT GTC	823
Arg Gln Leu Gln Cys Gln Asn Asp Gln Arg Gly Glu Ile Val Arg Val	
250 255 260	

GAA CAC GGG CTC AGT TTG CTG CAG CCA TAT GCA TCA TTG CAG GAG CAG	871
Glu His Gly Leu Ser Leu Leu Gln Pro Tyr Ala Ser Leu Gln Glu Gln	
265 270 275	
GAA CAA GGA CAA GTG CAA TCA AGA GAG CGT TAT CAA GAA GGA CAA TAT	919
Glu Gln Gly Gln Val Gln Ser Arg Glu Arg Tyr Gln Glu Gly Gln Tyr	
280 285 290 295	
CAG CAA AGT CAA TAT GGA AGT GGC TGC TCT AAC GGT TTG GAT GAG ACC	967
Gln Gln Ser Gln Tyr Gly Ser Gly Cys Ser Asn Gly Leu Asp Glu Thr	
300 305 310	
TTT TGC ACC CTG AGG GTA AGG CAA AAC ATC GAT AAT CCT AAC CGT GCT	1015
Phe Cys Thr Leu Arg Val Arg Gln Asn Ile Asp Asn Pro Asn Arg Ala	
315 320 325	
GAT ACA TAC AAT CCA AGA GCT GGA AGG GTT ACA AAT CTC AAC ACC CAG	1063
Asp Thr Tyr Asn Pro Arg Ala Gly Arg Val Thr Asn Leu Asn Thr Gln	
330 335 340	
AAT TTC CCC ATT CTC AGT CTT GTA CAG ATG AGT GCA GTC AAA GTA AAT	1111
Asn Phe Pro Ile Leu Ser Leu Val Gln Met Ser Ala Val Lys Val Asn	
345 350 355	
CTA TAC CAG AAT GCA CTC CTT TCA CCA TTT TGG AAC ATC AAC GCT CAC	1159
Leu Tyr Gln Asn Ala Leu Leu Ser Pro Phe Trp Asn Ile Asn Ala His	
360 365 370 375	
AGC GTC GTG TAT ATT ACT CAA GGC CGT GCC CGG GTT CAA GTT GTC AAC	1207
Ser Val Val Tyr Ile Thr Gln Gly Arg Ala Arg Val Gln Val Val Asn	
380 385 390	
AAC AAT GGA AAG ACA GTG TTC AAC GGC GAG CTT CGC CGC GGA CAG CTG	1255
Asn Asn Gly Lys Thr Val Phe Asn Gly Glu Leu Arg Arg Gly Gln Leu	
395 400 405	
CTT ATT ATA CCA CAA CAC TAC GCA GTT GTA AAG AAG GCA CAA AGA GAA	1303
Leu Ile Ile Pro Gln His Tyr Ala Val Val Lys Lys Ala Gln Arg Glu	
410 415 420	
GGA TGT GCT TAC ATT GCA TTC AAG ACC AAT CCT AAC TCT ATG GTA AGC	1351
Gly Cys Ala Tyr Ile Ala Phe Lys Thr Asn Pro Asn Ser Met Val Ser	
425 430 435	

CAC ATT GCA GGA AAG AGT TCC ATC TTC CGT GCT CTC CCA AAT GAT GTT 1399
 His Ile Ala Gly Lys Ser Ser Ile Phe Arg Ala Leu Pro Asn Asp Val
 440 445 450 455
 CTA GCA AAT GCA TAT CGC ATC TCA AGA GAA GAG GCT CAG AGG CTC AAG 1447
 Leu Ala Asn Ala Tyr Arg Ile Ser Arg Glu Glu Ala Gln Arg Leu Lys
 460 465 470
 CAT AAT AGA GGA GAT GAG TTC GGT GCA TTC ACT CCA ATC CAA TAC AAG 1495
 His Asn Arg Gly Asp Glu Phe Gly Ala Phe Thr Pro Ile Gln Tyr Lys
 475 480 485
 AGC TAC CAA GAC GTT TAT AAT GCG GCA GAA TCC TCT TAG GTCGGCTTGC GG 1546
 Ser Tyr Gln Asp Val Tyr Asn Ala Ala Glu Ser Ser Stop
 490 495 500
 ATAAAGAATA ACTAAATAAA TAAATTGCAA GCAATTGTTT TGCTGCTATG TACTGTCCAG 1606
 TCTTTCGACT AATGATGATA AAGCCTCTCT TTATCCTT 1644

配列番号 2

配列の長さ: 1 6 3 4

配列の型: 核酸

鎖の数: 2 本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

起源

生物名:

性質: グルテリンBのcDNA

配列の特徴

配列

GTACAAATAG CT ATG GCG AGC TCC GTT TTC TCT CGG TTT TCT ATA TAC TTT 51
 Met Ala Ser Ser Val Phe Ser Arg Phe Ser Ile Tyr Phe
 1 5 10
 TGT GTT CTT CTA TTA TGC CAT GGT TCT ATG GCC CAG CTA TTT AAT CCC 99
 Cys Val Leu Leu Leu Cys His Gly Ser Met Ala Gln Leu Phe Asn Pro
 15 20 25

AGC ACA AAC CCA TGG CAT AGT CCT CGG CAA GGA AGT TTT AGG GAG TGT	147
Ser Thr Asn Pro Trp His Ser Pro Arg Gln Gly Ser Phe Arg Glu Cys	
30 35 40 45	
AGA TTT GAT AGA CTA CAA GCA TTT GAA CCA CTT CGG AAA GTG AGG TCA	195
Arg Phe Asp Arg Leu Gln Ala Phe Glu Pro Leu Arg Lys Val Arg Ser	
50 55 60	
GAA GCT GGG GTG ACT GAG TAC TTC GAT GAG AAG AAT GAA TTA TTC CAG	243
Glu Ala Gly Val Thr Glu Tyr Phe Asp Glu Lys Asn Glu Leu Phe Gln	
65 70 75	
TGC ACG GGT ACT TTT GTG ATC CGA CGT GTC ATT CAG CCT CAA GGC CTT	291
Cys Thr Gly Thr Phe Val Ile Arg Arg Val Ile Gln Pro Gln Gly Leu	
80 85 90	
TTG GTA CCT CGA TAC ACA AAT ATT CCT GGC GTG GTC TAC ATC ATC CAA	339
Leu Val Pro Arg Tyr Thr Asn Ile Pro Gly Val Val Tyr Ile Ile Gln	
95 100 105	
GGG AGA GGT TCT ATG GGT TTA ACC TTC CCC GGT TGC CCT GCG ACT TAC	387
Gly Arg Gly Ser Met Gly Leu Thr Phe Pro Gly Cys Pro Ala Thr Tyr	
110 115 120 125	
CAG CAA CAA TTC CAA CAA TTT TCA TCT CAA GGC CAA AGT CAG AGC CAA	435
Gln Gln Gln Phe Gln Gln Phe Ser Ser Gln Gly Gln Ser Gln Ser Gln	
130 135 140	
AAG TTT AGA GAT GAG CAC CAA AAG ATT CAT CAA TTT AGG CAA GGA GAC	483
Lys Phe Arg Asp Glu His Gln Lys Ile His Gln Phe Arg Gln Gly Asp	
145 150 155	
ATT GTT GCT CTC CCA GCT GGT GTT GCA CAT TGG TTC TAC AAT GAT GGT	531
Ile Val Ala Leu Pro Ala Gly Val Ala His Trp Phe Tyr Asn Asp Gly	
160 165 170	
GAT CGC CAT ATT GTT GCC GTA TAT GTT TAT GAC GTA AAC AAC AAC GCC	579
Asp Arg His Ile Val Ala Val Tyr Val Tyr Asp Val Asn Asn Asn Ala	
175 180 185	
AAT CAG CTT GAA CCT AGG CAA AAG GAG TTC CTA TTA GCC GGC AAC AAC	627
Asn Gln Leu Glu Pro Arg Gln Lys Glu Phe Leu Leu Ala Gly Asn Asn	
190 195 200 205	

AAT CGG GCT CAA CAA CAA CAA GTA TAT GGT AGC TCA ATT GAG CAA CAC	675
Asn Arg Ala Gln Gln Gln Gln Val Tyr Gly Ser Ser Ile Glu Gln His	
210 215 220	
TCT GGG CAA AAC ATA TTC AGC GGA TTT GGT GTT GAG ATG CTA AGT GAG	723
Ser Gly Gln Asn Ile Phe Ser Gly Phe Gly Val Glu Met Leu Ser Glu	
225 230 235	
GCT TTA GGC ATC AAC GCA GTA GCA GCA AAG AGG CTA CAG AGC CCA AAT	771
Ala Leu Gly Ile Asn Ala Val Ala Ala Lys Arg Leu Gln Ser Pro Asn	
240 245 250	
GAT CAA AGA GGA GAG ATC ATA CAT GTG AAG AAT GGC CTT CAA TTG TTG	819
Asp Gln Arg Gly Glu Ile Ile His Val Lys Asn Gly Leu Gln Leu Leu	
255 260 265	
AAA CCG ACT TTG ACA CAA CAG CAA GAA CAA GCA CAA GCA CAA GAT CAA	867
Lys Pro Thr Leu Thr Gln Gln Gln Glu Gln Ala Gln Ala Gln Asp Gln	
270 275 280 285	
TAT CAA CAA GTT CAA TAC AGT GAA CGA CAG CAA ACA TCT TCT CGA TGG	915
Tyr Gln Gln Val Gln Tyr Ser Glu Arg Gln Gln Thr Ser Ser Arg Trp	
290 295 300	
AAC GGA TTG GAG GAG AAC TTT TGC ACG ATC AAG GTG AGA GTA AAC ATT	963
Asn Gly Leu Glu Glu Asn Phe Cys Thr Ile Lys Val Arg Val Asn Ile	
305 310 315	
GAA AAT CCT AGT CGT GCT GAT TCA TAC AAC CCA CGT GCC GGA AGG ATA	1011
Glu Asn Pro Ser Arg Ala Asp Ser Tyr Asn Pro Arg Ala Gly Arg Ile	
320 325 330	
ACA AGT GTC AAT AGT CAG AAG TTC CCC ATC CTT AAC CTC ATC CAA ATG	1059
Thr Ser Val Asn Ser Gln Lys Phe Pro Ile Leu Asn Leu Ile Gln Met	
335 340 345	
AGC GCT ACC AGA GTA AAC CTA TAC CAG AAT GCT ATT CTC TCG CCG TTC	1107
Ser Ala Thr Arg Val Asn Leu Tyr Gln Asn Ala Ile Leu Ser Pro Phe	
350 355 360 365	
TGG AAC GTC AAT GCT CAT AGT TTG GTC TAT ATG ATT CAA GGG CGA TCT	1155
Trp Asn Val Asn Ala His Ser Leu Val Tyr Met Ile Gln Gly Arg Ser	
370 375 380	

CGA GTT CAA GTC GTT AGT AAC TTT GGA AAG ACT GTG TTT GAT GGT GTC 1203
 Arg Val Gln Val Val Ser Asn Phe Gly Lys Thr Val Phe Asp Gly Val
 385 390 395
 CTT CGC CCA GGA CAA TTA TTG ATC ATT CCG CAA CAT TAT GCT GTC TTG 1251
 Leu Arg Pro Gly Gln Leu Leu Ile Ile Pro Gln His Tyr Ala Val Leu
 400 405 410
 AAG AAA GCA GAG CGT GAA GGA TGC CAA TAT ATC GCA ATC AAG ACA AAC 1299
 Lys Lys Ala Glu Arg Glu Gly Cys Gln Tyr Ile Ala Ile Lys Thr Asn
 415 420 425
 GCT AAC ACC TTC GTC AGC CAC CTT GCA GGG AAA AAC TCA GTA TTC CGT 1347
 Ala Asn Thr Phe Val Ser His Leu Ala Gly Lys Asn Ser Val Phe Arg
 430 435 440 445
 GCC TTG CCA GTT GAT GTA GTC GCT AAT GCG TAT CGC ATC TCA AGG GAG 1395
 Ala Leu Pro Val Asp Val Val Ala Asn Ala Tyr Arg Ile Ser Arg Glu
 450 455 460
 CAA GCC CGA AGC CTC AAG AAC AAC AGG GGA GAA GAG CAC GGT GCC TTC 1443
 Gln Ala Arg Ser Leu Lys Asn Asn Arg Gly Glu Glu His Gly Ala Phe
 465 470 475
 ACT CCT AGA TTT CAA CAA CAA TAC TAC CCA GGA TTA TCG AAT GAG TCC 1491
 Thr Pro Arg Phe Gln Gln Gln Tyr Tyr Pro Gly Leu Ser Asn Glu Ser
 480 485 490
 GAA AGC GAG ACC TCA GAG TAA TGTAATGTAA TTGAGAACTA GTATCGGCGT AGAG 1546
 Glu Ser Glu Thr Ser Glu Stop
 495 500
 TAAATAAAA CACCACAAGT ATGACACTTG GTGGTGATTC TGTTCGATAT CAGTACTAAA 1606
 TAAAGGTTAC AAACCTCTTA ATTTTCCT 1634

配列番号 3

配列の長さ : 30

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴

配列

AGTGGGCTGC AGGAATTCGA TATCAAGCTT 30

配列番号 4

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

配列

AGTACATAGC AGCAAAACAT 20

配列番号 5

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

配列

TACATAGCTT TAACTGATAA TCTGA 25

配列番号 6

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

配列

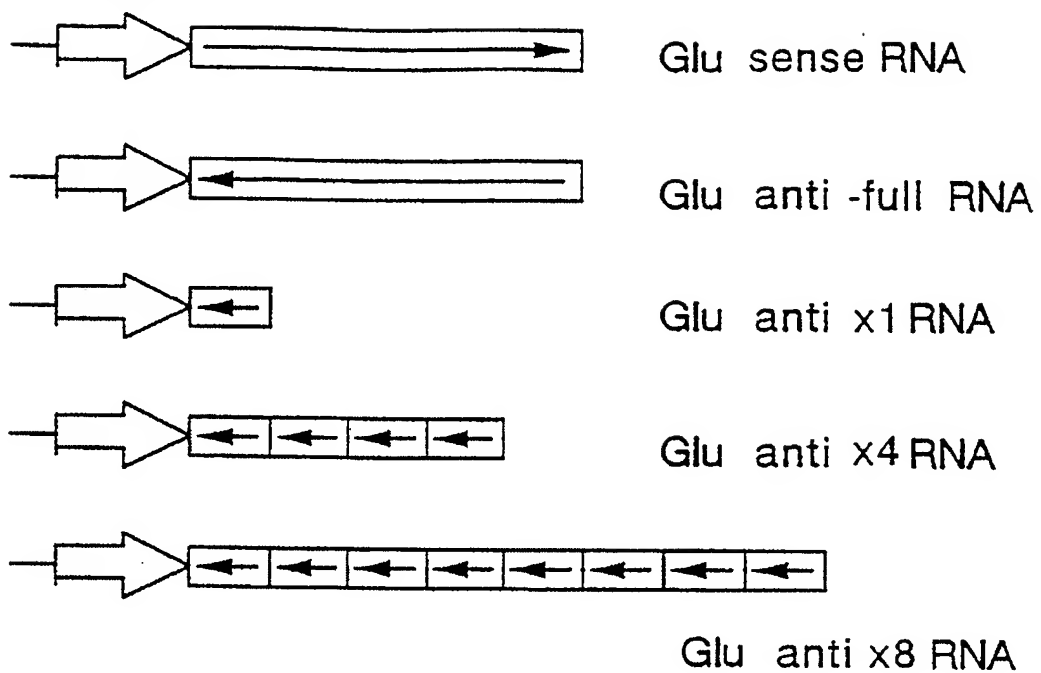
AGTACATAGC AGCAAAACAT 20

請求の範囲

1. 所望の構造遺伝子もしくはその一部の配列をアンチセンス方向に複数個連続して連結して含むアンチセンス塩基配列。
2. 所望の構造遺伝子の5'側の一部の配列をアンチセンス方向に複数個連続して連結して含む、請求項1に記載のアンチセンス塩基配列。
3. 前記一部の配列の長さが45塩基以上である、請求項1または2記載のアンチセンス塩基配列。
4. 前記一部の配列の長さが300塩基以上である、請求項1または2記載のアンチセンス塩基配列。
5. 前記複数個が少なくとも4個以上である、請求項1から4のいずれか1項に記載のアンチセンス塩基配列。
6. 前記複数個が少なくとも8個以上である、請求項1から4のいずれか1項に記載のアンチセンス塩基配列。
7. 前記の所望の構造遺伝子もしくはその一部の配列が、異なる種類の複数の構造遺伝子もしくはその一部の配列から構成されている、請求項1から6のいずれか1項に記載のアンチセンス塩基配列。
8. 前記構造遺伝子が植物種子の貯蔵タンパク質をコードする遺伝子である、請求項1から7のいずれか1項に記載のアンチセンス塩基配列。
9. 前記構造遺伝子がグルテリンAもしくはグルテリンBをコードする遺伝子である、請求項1から8のいずれか1項に記載のアンチセンス塩基配列。
10. 請求項1から9のいずれか1項に記載のアンチセンス塩基配列を有する発現ベクター。
 11. 請求項10に記載の発現ベクターにより形質転換された形質転換体。
 12. 形質転換体が植物である、請求項11に記載の形質転換体。
 13. 形質転換体がイネである、請求項11または12に記載の形質転換体。
 14. 請求項1から9のいずれか1項に記載されたアンチセンス塩基配列を標的細胞のゲノム遺伝子中に導入することを含む、構造遺伝子がコードするタンパク質の細胞内における発現を抑制する方法。

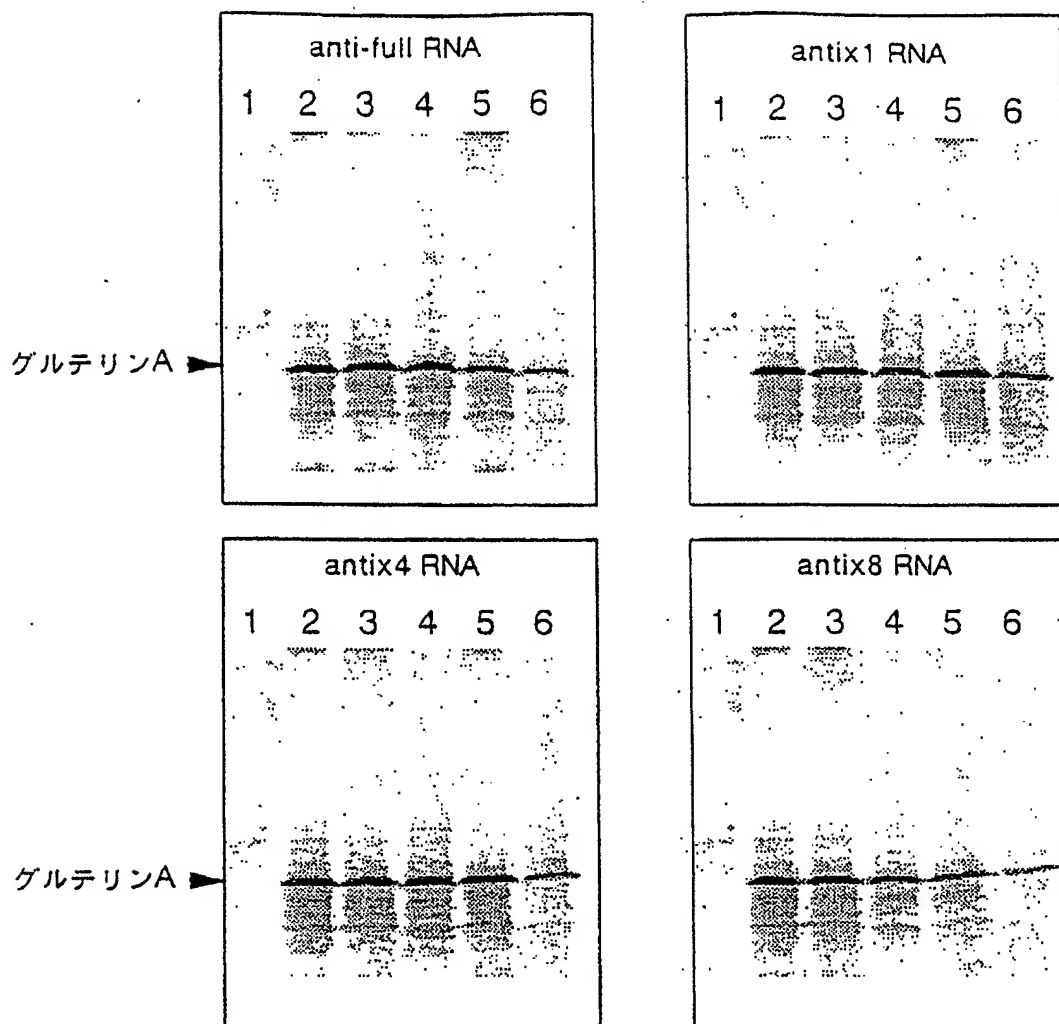
図 1

T7 RNA Pol.



in vitro RNA 合成に用いた遺伝子の構造

図 2



小麦胚芽抽出液による翻訳産物の解析

レーン1 RNA なし

レーン2 ゲルテリン sense RNA のみ (2p moles)

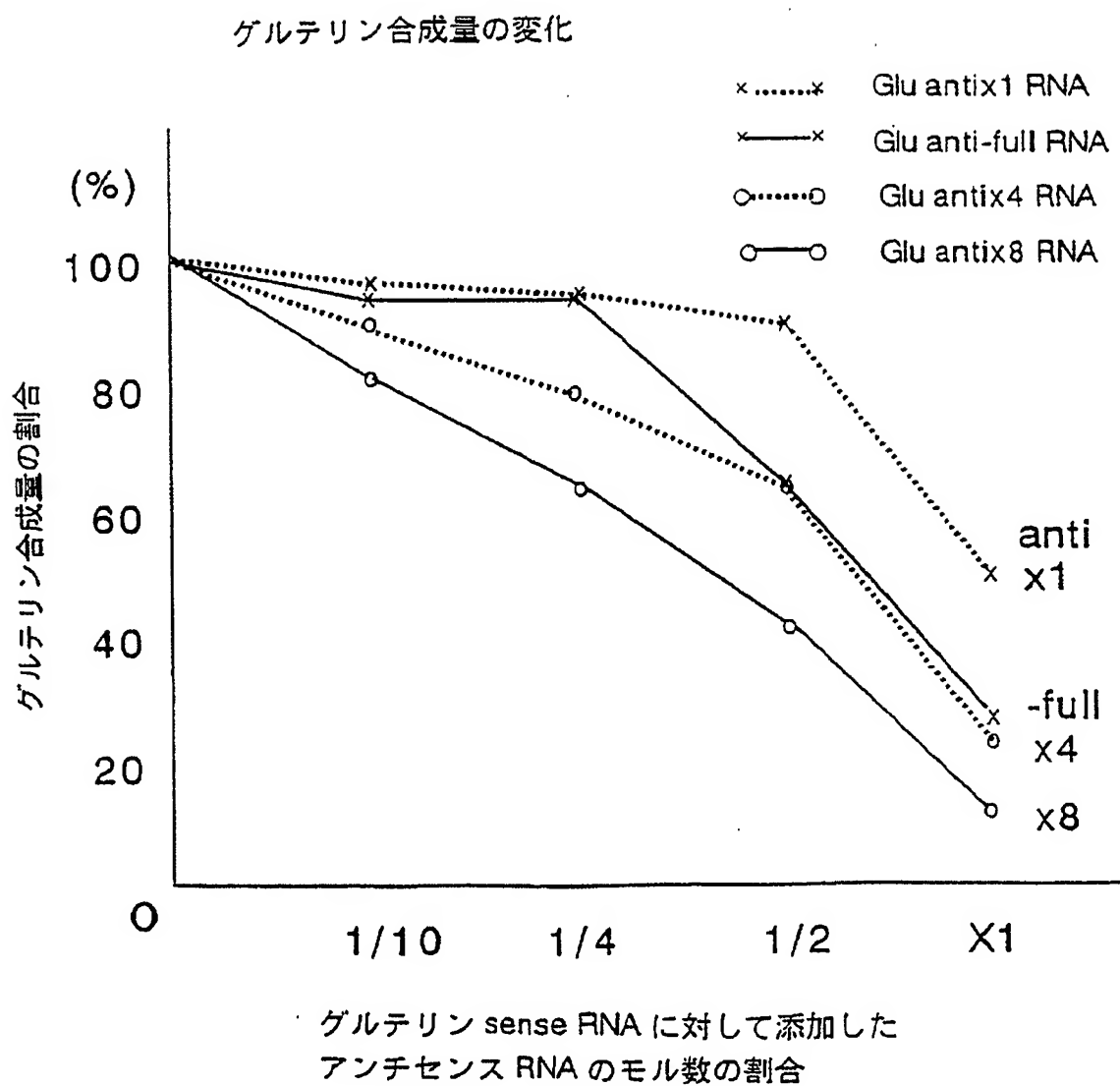
レーン3 アンチセンス RNA 0.2p moles 添加

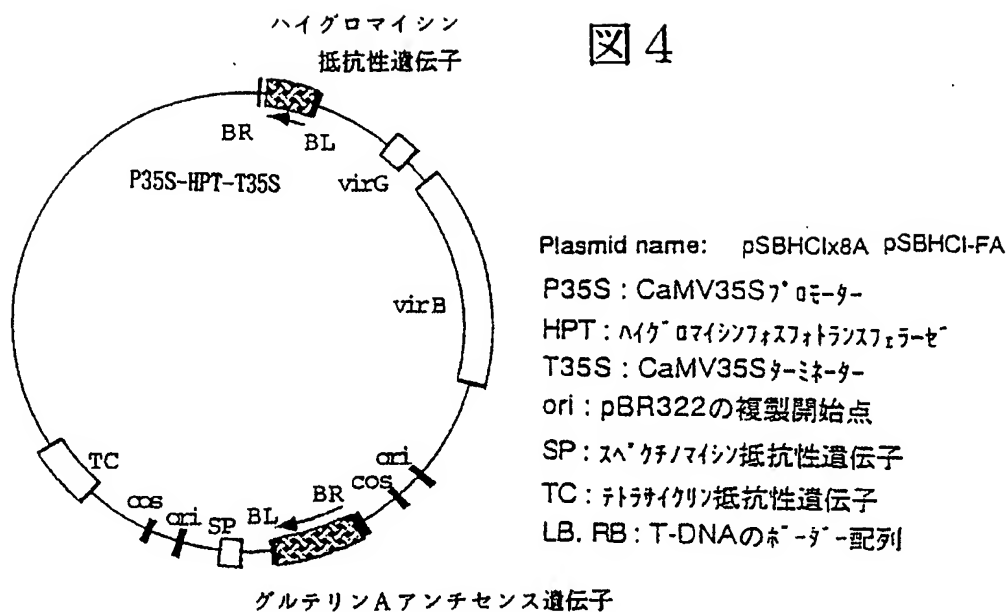
レーン4 アンチセンス RNA 0.5p moles 添加

レーン5 アンチセンス RNA 1p moles 添加

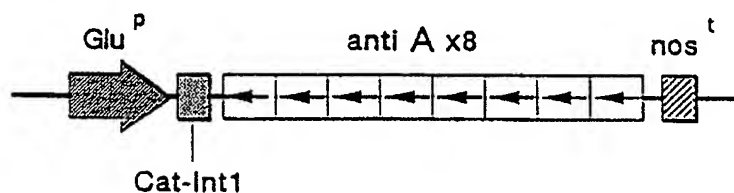
レーン6 アンチセンス RNA 2p moles 添加

図 3

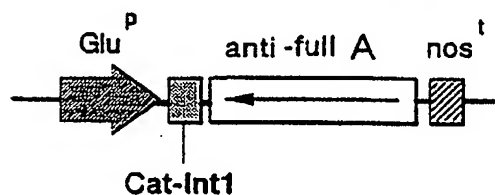




(1) 8連結グルテリンアンチセンス遺伝子(3.7kbp)



(2) 完全長グルテリンアンチセンス遺伝子(2.9kbp)

Glu^P : グルテリンプロモーター

anti x8A : グルテリンAの8連結アンチセンス配列

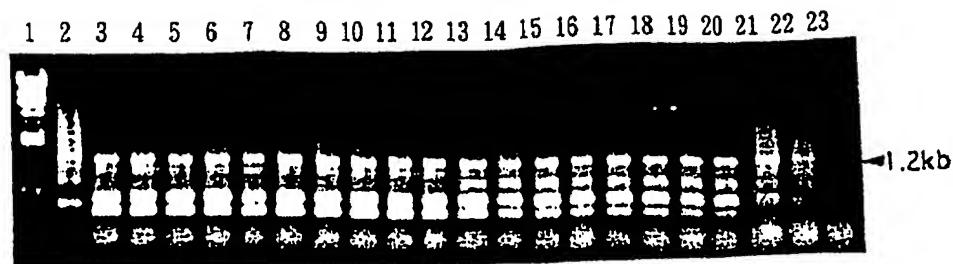
Cat-Int1 : ヒカチラーゼ遺伝子の
第1イントロン

anti-fullA : グルテリンAの完全長アンチセンス配列

nos^t : バリシン合成酵素遺伝子のターミネーター

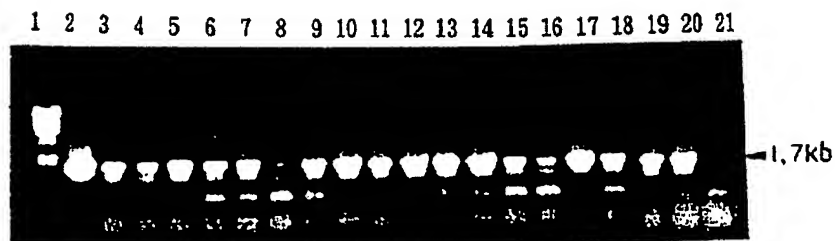
形質転換に用いたプラスミドベクターの構造

図 5



8連結グルテリンAアンチセンス遺伝子を導入した形質転換体のPCR分析

図 6



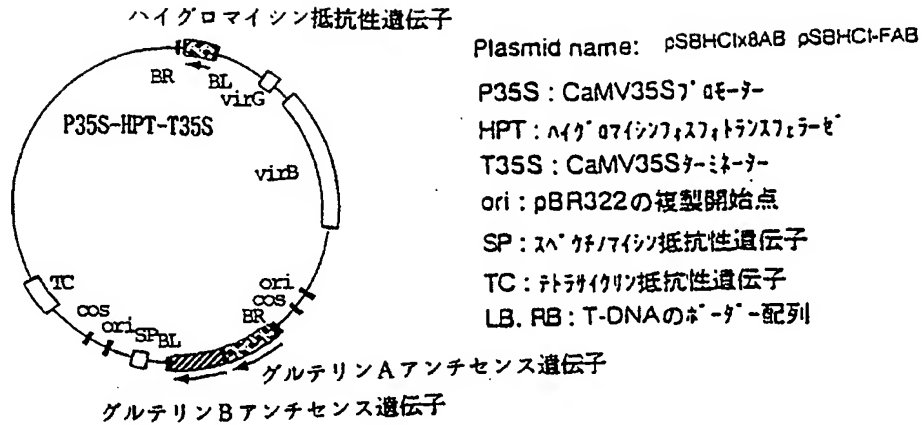
完全長グリテリンAアンチセンス遺伝子を導入した形質転換体のPCR分析

図 7

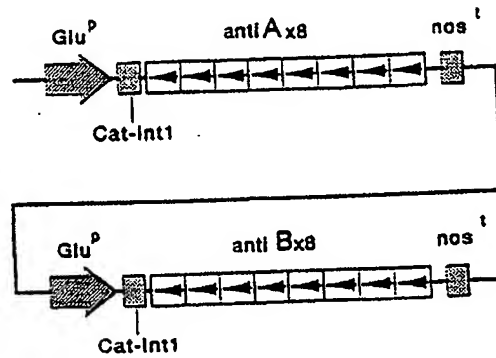


8連結グルテリンAアンチセンス遺伝子を導入した形質転換体のノーザン分析

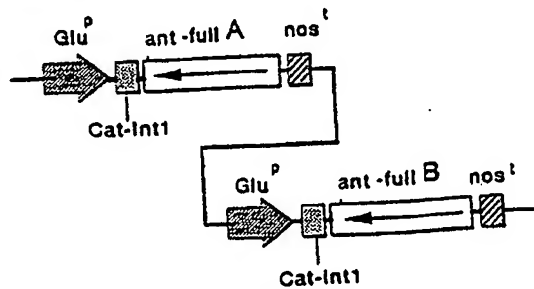
図 8



(1) 8 連結グルテリン A・B アンチセンス遺伝子 (7.4 kbp)



(2) 完全長グルテリン A・B アンチセンス遺伝子 (5.8 kbp)



Glu^P: グルテリン A プロモーター

anti x8A: グルテリン A の 8 連結アンチセンス配列

Cat-Int1: ヒタカチラーゼ遺伝子の第 1 イントロン

anti x8B: グルテリン B の 8 連結アンチセンス配列

anti-full A: グルテリン A の完全長アンチセンス配列

nos^t: ノバリン合成酵素遺伝子のターミネーター

anti-full B: グルテリン B の完全長アンチセンス配列

形質転換に用いたプラスミドベクターの構造

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00955

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁶ C12N15/29, C12N15/63, C12N5/10, A01H1/00, A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁶ C12N15/29, C12N15/63, C12N5/10, A01H1/00, A01H5/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 60-232092, A (The Research Foundation of State University of New York), November 18, 1985 (18. 11. 85),	1,2,5-7,10, 11,14
Y	& EP, 140308, A1 & JP, 9-135686, A	3,4,8,9,12, 13
Y	TADA, Y. et al., "Environmental risk evaluation of transgenic rice expressing an antisense gene for 16kDa albumin(I)", Breeding Science (1996) Vol. 46, No. 4, pages 403-407	3,4,8,9, 12,13
Y	OKITA, T.W. et al., "Structure and expression of the rice glutelin multigene family", The Journal of Biological Chemistry (1989), Vol. 264, No. 21, pages 12573-12581	8,9,12,13
Y	HIEI, Y. et al., "Efficient transformation of rice...", Plant Journal (1994) Vol. 6, No. 2	12,13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
June 1, 1998 (01. 06. 98)Date of mailing of the international search report
June 9, 1998 (09. 06. 98)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP98/00955

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N 15/29, C12N 15/63, C12N 5/10, A01H 1/00,
A01H 5/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N 15/29, C12N 15/63, C12N 5/10, A01H 1/00,
A01H 5/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 60-232092, A (ザ リサーチ フアンデーション オブ ステイト ユニバーシティー オブ ニューヨーク) 18. 11月. 1985 (18. 11. 85)	1-2, 5-7, 10-11, 14
Y	& EP, 140308, A1 & JP, 9-135686, A	3-4, 8-9, 12-13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01. 06. 98

国際調査報告の発送日

09.06.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

4B 9358

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	TADA, Y. et al. "Environmental risk evaluation of transgenic rice expressing an antisense gene for 16kDa albumin(I)", Breeding Science (1996) 第46巻, 第4号, p. 403 - 407	3-4, 8-9 12-13
Y	OKITA, T.W. et al. "Structure and expression of the rice glutelin multigene family", The Journal of Biological Chemistry (1989) 第264巻, 第21号, p. 12573 - 12581	8-9, 12-13
Y	HIEI, Y. et al. "Efficient transformation of rice ...", Plant Journal (1994) 第6巻, 第2号, p. 271 - 282	12-13